

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 5 月 23 日 (23.05.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/39813 A1

- (51) 国際特許分類: A01K 67/027, G01N 33/15, 33/50, C12N 15/12, C07K 16/42, 14/47 (71) 出願人 および
(72) 発明者: 本庶 佑 (HONJO, Tasuku) [JP/JP]; 〒606-0001 京都府京都市左京区岩倉大鷲町19-4 Kyoto (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/09951 (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 西村 泰行 (NISHIMURA, Hiroyuki) [JP/JP]; 02215-5409 マサチューセッツ州、ボストン、ブルックリン通 400 アパートメント24A Massachusetts (US).
- (22) 国際出願日: 2001 年 11 月 14 日 (14.11.2001) (74) 代理人: 弁理士 大家邦久 (OHIE, Kunihisa); 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口第2ビル7階 大家特許事務所 Tokyo (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2000-347392
2000 年 11 月 15 日 (15.11.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 小野薬品工業株式会社 (ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒541-8526 大阪府大阪市中央区道修町2丁目1番5号 Osaka (JP).

[続葉有]

(54) Title: PD-1-LACKING MOUSE AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: PD-1欠損マウスおよびその用途

(57) Abstract: A BALB/c mouse lacking programmed cell death-1 receptor (PD-1); a method of screening a remedy for an autoimmune disease by using this mouse; an IgG autoreactive antibody specifically produced by the mouse; a protein produced in the heart which specifically reacts with this antibody; and a method of diagnosing dilated cardiomyopathy with the use of this protein. Because of spontaneously suffering from autoimmune diseases, in particular, dilated cardiomyopathy, the PD-1-lacking BALB/c mouse is useful in screening remedies for these diseases.

(57) 要約:

プログラムドセルデス-1受容体(PD-1)を欠損したBALB/c系マウス、そのマウスを用いる自己免疫疾患治療剤のスクリーニング方法、そのマウスが特異的に産生するIgG自己反応性抗体、その抗体に特異的に反応する心臓が産生する蛋白、およびその蛋白を用いる拡張型心筋症の診断方法に関する。

PD-1を欠損したBALB/c系マウスは、自己免疫疾患、特に拡張型心筋症を自然発症するため、これらの疾患の治療剤をスクリーニングするために有用である。



(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

PD-1 欠損マウスおよびその用途

5 技術分野

本発明は、プログラムドセルデス-1 受容体（以下、PD-1 と略する。）を欠損したBALB/c系マウスおよびその用途に関する。さらに詳しく言えば、PD-1 を欠損したBALB/c系マウス、そのマウスを用いる自己免疫疾患治療剤のスクリーニング方法、そのマウスが特異的に産生するIgG自己反応性抗体、その抗体に特異的に反応する心臓が産生する蛋白、およびその蛋白を用いる拡張型心筋症の診断方法に関する。

背景技術

発生学的に、また生理学的にコントロールされた細胞の死は種々の動物のほとんどあらゆる組織で観察することができる。その様な細胞の死は一般的に「プログラムされた細胞死」または「計画的細胞死」と呼ばれ、病理学的メカニズムによって「偶然に起こる細胞死」とは区別されている。

PD-1 は、細胞が活性化を経て計画的細胞死に至る過程に関わる受容体として、マウスでまず見出された (The EMBO J., vol. 11 (11), 3887-3895 (1992) ; 特開平 5-336973 号 ; EMBL/GenBank/DDJB Acc. No. X67914)。ついで、マウスPD-1 をプローブとして用いることにより、ヒトでも見出された (Genomics 23:704 (1994) ; 特開平 7-291996 号)。PD-1 はリンパ球で活性化に伴い発現され、PD-1 欠損マウスの研究 (International Immunology, Vol. 10 (10), 1563-1572 (1998) ; Immunity, Vol. 11, 141-151 (1999)) より自己免疫疾患と深く係わるところから、免疫機能の低下または亢進、感染症、移植時の拒絶反応、腫瘍等の治療や診断に用いられるこ

とが示唆される。

マウスPD-1もヒトPD-1も288個のアミノ酸からなり、N末端のシグナルペプチド(20アミノ酸)と中間部位の細胞膜貫通領域に疎水性領域を有する55kDaのI型膜結合型蛋白である。

- 5 欠損マウス(ノックアウトマウスとも言われる。)とは、人為的に特定の遺伝子を修飾されたことによって、生まれながらにその遺伝子産物を産生できないマウスを指し、その遺伝子産物である因子・受容体等の役割を調べるために作製されるものである。

- 10 一方、拡張型心筋症とは、左室の拡張を伴った左心室の収縮機能不全を指す。拡張型心筋症と見做される患者のうち30%は、細胞内の細胞骨格を細胞間マトリックスへ連結している心筋の重要成分に対する構造遺伝子の先天的な変異によるとされているが、残りの症例は原因不明のままである。どちらの場合も、疾患は進行性で生命を脅かすものであり、現時点では心臓移植以外有効な治療法はない。

- 15 PD-1欠損マウスは、最初にC57BL/6(以下、B6と省略する。)マウスで作成された。PD-1を欠損したC57BL/6マウスは、ループス様腎炎および関節炎等の所謂自己免疫疾患を自然発症することが確認された(International Immunology, Vol.10(10), 1563-1572(1998); Immunity, Vol.11, 141-151(1999))。

- 20 しかしながら、他の系統のマウスでPD-1を欠損させた場合については、その遺伝背景の違いがPD-1を欠損に対してどのような影響を及ぼすか全く知られていない。

発明の開示

- 25 本発明は、

1. PD-1受容体を欠損したBALB/c系マウス、

2. 前項1に記載のマウスを用いることを特徴とする自己免疫疾患治療剤のスクリーニング方法、
3. 自己抗体を産生することによる自己免疫疾患に対する前項2記載のスクリーニング方法、
- 5 4. 免疫疾患が、拡張型心筋症である前項2記載のスクリーニング方法、
5. 前項1記載のマウスが特異的に産生するIgG自己反応性抗体、
6. 前項5記載のIgG自己反応性抗体に特異的に反応し、心臓で特異的に産生される約33kDa (33kDa \pm 5kDa)の蛋白、
7. 前項6記載の蛋白を用いることを特徴とする拡張型心筋症の診断方法、
- 10 8. 前項7記載の蛋白をコードする遺伝子を検出することを特徴とする拡張型心筋症の(遺伝子)診断方法に関する。

[本発明マウスの特徴]

- PD-1を欠損したBALB/c系マウス(PD-1(-/-)と表記する。)は、生後5週齢目から死亡し始め、30週齢までには、その2/3が死亡する。正常なBALB/cマウス(PD-1(+/-)と表記する。)には、その様な兆候は見られない。また、PD-1を欠失したC57BL/6(B6-PD-1(-/-)と表記する。)には、ループス様腎炎および関節炎の発症は見られたが、初期段階の死亡は見られなかった。

- 20 本発明PD-1(-/-)マウスは、後述する剖検の結果、超音波検査による心機能の評価、電子顕微鏡での観察、免疫応答等の事実から、拡張型心筋症を自然発症し、死亡するものと判断された。

- IgG1サブクラスの自己免疫抗体を産生し、この抗体が心臓で特異的に産生される約33kDaの蛋白に結合して集積するため、自己免疫疾患型の
- 25 拡張型心筋症を引き起こしたものと考えられる。

加齢C57BL/6-PD-1(-/-)マウスはループス性糸球体腎炎

及び関節炎に罹り易いが、心臓疾患はない事実を加味すると、PD-1の機能不全は自己免疫疾患の潜在的な素因となり、その素因と遺伝的背景の組み合わせによって様々な型の疾患を招き得ることを示している。

- この様に、拡張型心筋症の原因が、心筋を標的とした内因性の調節障害による自己免疫疾患であるという可能性、すなわちこれまで証明されていない可能性が示唆された。

図面の簡単な説明

- 図1は、BALB/c-PD-1 (-/-) マウス (黒丸)、PD-1 (+/-) マウス (白抜きの三角) およびPD-1 (+/+) (白抜きの四角) の生存曲線を示す (%は45週令の生存率を示し、括弧内の数値は観察したマウスの数を示す)。

- 図2は、PD-1 (-/-) マウスおよび正常 (PD-1 (+/+)) についての経胸壁超音波心臓図検査の結果を示す。図2 (A) はLVDd (左心室拡張期末期寸法)、(B) はLVDS (左心室収縮期末期寸法)、(C) は心室分画短縮率%を示し、pはtの値を示す。

- 図3は、BALB/c (n=4)、心臓の肥大したBALB/c-PD-1 (-/-) (n=9)、発症していないBALB/c-PD-1 (-/-) (n=6)、B6 (n=2)、およびB6-PD-1 (-/-) (n=5) の各マウス血清の正常心臓抽出物に対するIgG自己抗体の電気パターンを示す。

- 図4は、週令の一致したBALB/c及びBALB/c-PD-1 (-/-) マウスの血清の心臓、肝臓、腎臓及び骨格筋の組織抽出物に対する図3と同様な免疫反応性を示す。

- 図5は、PD-1 (-/-) マウスにおける心臓の33kDa抗原を認識する血清自己抗体のアイソタイプを示す。

図6は、正常BALB/c、病気に冒されたPD-1 (-/-) マウスの心臓抽出溶離物、およびPD-1 (-/-) マウス血清の免疫反応性を示す。

発明の詳細な説明

1. 本発明マウスの取得方法：

- 5 PD-1 受容体を欠損した本発明のBALB/c系マウスは、
- (1) PD-1を欠損したC57BL/6 (B6) 系マウスを少なくとも10世代以上、BALB/c系マウスに戻し交配するか、または、
- (2) BALB/c系マウスの胚芽基幹 (ES) 細胞株から、International Immunology, Vol.10(10), 1563-1572(1998)記載の方法により、作製する
- 10 ことができる。

例えば、PD-1遺伝子の含んだ染色体断片（但し、そのエクソンの一部を欠失したもの、例えばエクソン2 - 5のみを含む断片）を挿入した標的ベクターを、BALB/c系マウスのES細胞株に導入し、染色体上のPD-1遺伝子の位置に標的ベクターが相同性組替えを起こしたES細胞クローン

15 を選抜することができる。このPD-1遺伝子が欠失したES細胞からBALB/c系キメラマウスを作製し、ジャームラインにこの欠失をトランスミットしたキメラマウスを親としてBALB/c系PD-1欠損マウスを作製することができる。

2. スクリーニング：

- 20 本発明のBALB/c系PD-1欠損マウスを用いて、自己免疫疾患、特に拡張型心筋症の治療薬をスクリーニングすることができる。また、自己抗体を産生することにより発症する自己免疫疾患の治療薬のスクリーニングにも使用できる。

本発明のBALB/c系PD-1欠損マウスは、拡張型心筋症を発症して

25 死亡する。本PD-1欠損マウスに薬剤を投与した後、生存・延命を指標に評価すれば、簡単にスクリーニングを行なうことができる。あるいは、本P

D-1 欠損マウスが産生する自己抗体量を指標にすることによっても、より効率良く治療薬のスクリーニングを行うことが可能である。

3. 本発明のBALB/c系PD-1欠損マウスが産生するIgG抗体とその抗体が認識する心臓で特異的に発現する約33kDa (33kDa ± 5kDa) の蛋白:

加齢により拡張型心筋症を発症した本PD-1欠損マウスは、その血液中に心臓特異的IgG抗体が確認され、その心臓にはIgG抗体が沈着していることが確認される。本IgG抗体は、心臓に発現される分子量約33kDaの蛋白を特異的に認識する。本PD-1欠損マウスでもまだ拡張型心筋症を発症していないマウスでは、このIgG抗体の産生は確認できるが、量的には十倍以上低い程度であった。

野生型のBALB/c系マウス、更にB6系PD-1欠損マウスでも本IgG抗体の産生は確認されない。従って、本IgG抗体は、本BALB/c系PD-1欠損マウスの拡張型心筋症の発症に深く関わっていることは明らかである。また、拡張型心筋症に深く係わる本IgG抗体は、B6系PD-1欠損マウスで確認されないことから、BALB/c系という特異的な遺伝背景の下で産生されるものと考えられる。また、B6系PD-1欠損マウスでは、所謂自己免疫疾患である関節炎・腎炎を発症することから、PD-1の機能不全は自己免疫疾患の潜在的な素因となり、その素因と遺伝的背景の組み合わせによって様々な型の疾患を招きうることを示している。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を挙げて本発明を、より具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を制限するものではない。

25

実施例 1 : BALB/c系PD-1欠損マウスの作成

- BALB/c系マウスの胚芽基幹（ES）細胞株から、International Immunology. Vol.10(10), 1563-1572(1998)記載の方法により、作製したC57BL/6系PD-1欠損マウスを、BALB/c系マウスに10世代戻し交配し、表記BALB/c系PD-1欠損マウスを得た。得られたマウスは、
5 無菌の施設で飼育した。

実施例2：BALB/c系PD-1欠損マウスの死亡原因

- 実施例1で得たBALB/c系PD-1欠損（PD-1（-/-））マウスを飼育すると、図1中、黒丸に示すように生後5週齢から死亡し始めた。
10 30週齢までには2/3が死亡した。それに対し、PD-1の欠損のない正常BALB/c系（PD-1（+/+））マウス（図1中白抜きの四角）では死亡例が認められなかった。B6PD-1欠損（PD-1（+/-））マウスの飼育の結果と共にまとめて図1に示す。

- PD-1（-/-）マウスは、死の数日前に眼球の突出を示し、剖検の結果、すべて異常に心臓が肥大していた。また、肝腫脹を示し、このことは死
15 因が鬱血性心不全であったことを示唆していた。

実施例3：組織学的検討

- 死亡したBALB/c系PD-1欠損マウスの組織学的な検討を行なった。
20 PD-1（-/-）マウスの右心室壁は正常マウスより薄く、両心室は直径がおおよそ2倍に肥大していた。

- 瘢痕形成を伴った細胞充実性で、間質性の線維症を含む散発的な線維性の反応があったが、肉眼では心室壁は正常に見えた。電子顕微鏡による検観では、心室壁全体に乱れて崩壊した筋フィラメントと不規則な形状のミトコン
25 ドリアを伴う心筋細胞の変性が散在していた。大多数のマウスの心房では、様々な大きさの、多くは巨大な、鬱血によると思われる血栓が認められた。

実施例 4：超音波心電検査

生存状態で心機能評価のために、PD-1 (-/-) マウスおよび正常 (PD-1 (+/+)) について経胸壁超音波心臓図検査を行った。結果を図 2 (A) (LV D d : 左心室拡張期寸法)、(B) (LV D S : 左心室収縮期末期寸法) および (C) (心室分画短縮率%) に示す。PD-1 (-/-) マウスの心室腔は、特に右心室で大きく肥大し、その壁の厚さは PD-1 (+/+) マウスのそれに比べて顕著に減少していた。左心室と心室中隔の動きは PD-1 (-/-) マウスでは拡張期 (LV D d) 及び収縮期 (LV D S) 共に低下し (Mモード)、収縮機能の指標である、心室分画短縮は、7 1.9% (PD-1 (+/+)) から 14.9% (PD-1 (-/-)) へと大きく低下した。

この事実は、PD-1 (-/-) マウスの心臓のポンプ機能が、肥大により冒されていることを示し、拡張型心筋症という診断を裏付けた。

15 実施例 5：免疫解析

BALB/c-Rag-2 (-/-) 背景での PD-1 (-/-) マウスは完全に健康だったので、BALB/c PD-1 (-/-) マウスにおける心疾患の発生は、免疫応答性の細胞の機能によるものと考えられたため、心臓に特異的な免疫反応の徴候を探した。

20 免疫蛍光法による解析の結果、PD-1 (-/-) マウスの心臓では心筋細胞を取り囲んで、IgG の線状の沈着が C3 補体と共に見られ、PD-1 (+/+) マウスの心臓ではそのような IgG の沈着は検出されなかった。

心臓壁全体に IgG の沈着はびまん性に認められた。IgG の線状の染色パターンは、組織特異的な自己抗体の結合であることを意味していた。他の
25 臓器では、IgG の沈着はほとんど検出されなかった。沈着した IgG のアイソタイプはほとんど IgG1 であった。

実施例 6：自己免疫反応

心臓に対する特異的な自己免疫反応を確認するため、心臓組織に対する自己抗体の存在の可能性を検討するためにBALB/c (n=4)、心臓の肥大したBALB/c-PD-1 (+/-) (n=9)、発症していないBALB/c-PD-1 (-/-) (n=6)、B6 (n=2)、およびB6-PD-1 (-/-) (n=5) の各マウスの血清を用いて、正常な心臓抽出物に対するIgG自己抗体を調べた。

すなわち、溶解緩衝液 (150 mMの塩化ナトリウム、25 mMのトリス塩酸緩衝液 (pH7.4)、5 mMのEDTA、1 %のNP40 (プロテアーゼ阻害剤)) 中でポリトロン・ホモジナイザーにて正常心臓の抽出物を調製した。溶解物を12.5 %のSDS-PAGEで電気泳動を行い、フィルター上に移し、希釈した血清と共にインキュベートして、ビオチン化抗マウスIgG及びストレプトアビジン-セイヨウワサビペルオキシダーゼにて検出した (なお、血清は30~300倍に連続希釈した)。結果を図3に示す。

病気のPD-1 (-/-) マウスの血清はすべて300倍希釈で、ほとんどは1000倍希釈でも33 kDaのタンパク質に対する自己抗体を示したが、PD-1 (+/+) マウスの血清は30倍希釈でもそのような自己抗体を示さなかった。

肉眼的に正常なPD-1 (-/-) マウス及び大半のPD-1 (+/-) マウスでは、自己抗体は30倍希釈では検出できたが、300倍希釈以上では検出できなかった。7.5 % SDS-PAGEを用いて同様の分析を行い、高い分子量の範囲について調べたが、バックグラウンド以上のシグナルは検出されなかった。

図3に示されるように、9匹のPD-1 (-/-) マウスから得た血清すべてから、300倍以上の希釈倍率でも、正常な心臓抽出物の中の33 kD

aのタンパク質と反応する力価の高いIgGが検出された。

図4に週令の一致したBALB/c及びBALB/c-PD-1 (-/-) マウスの血清の心臓、肝臓、腎臓及び骨格筋の組織抽出物に対する図3と同様な免疫反応性の結果を示す。週令の一致したPD-1 (+/+) マウスの血清からは、30倍の希釈倍率でも自己抗体は全く検出されなかった(4匹中0匹)。

剖検で肉眼的に心肥大を示さなかったPD-1 (-/-) マウスの血清は、同じ300倍希釈倍率では33kDaのタンパク質との十分な反応は示さなかった(6匹中0匹)。B6またはB6PD-1 (-/-) も反応は示さなかった。

しかし、前者は濃度を高くすれば反応を示した。従って、33kDaのタンパク質に対する高い力価のIgG自己抗体の存在は、拡張型心筋症の臨床的な徴候と完全に相関した。33kDaのタンパク質は、BALB/cPD-1 (-/-) 由来の同じ血清によっては、肝臓、腎臓又は骨格筋のようなその他の組織で検出されなかったので、33kDaの自己抗原は、心臓組織特異的であると思われた。

抗dsDNAを含む他の自己抗体はPD-1 (-/-) マウスの血清からは検出されなかった。自己抗体は、病気に冒されたすべてのPD-1 (-/-) マウスでは、ほとんどIgG1クラスであり(7匹中7匹)、心臓の免疫染色解析の結果を裏付けた(図5: PD-1 (-/-) マウスにおける心臓の33kDa抗原を認識する血清自己抗体のアイソタイプ参照)。

正常な心臓抽出物に対して、同じPD-1 (-/-) マウスの血清と共に溶離物の免疫反応性を調べるために、プロテインGビーズによって、組織抽出物を免疫沈降し、正常BALB/c及び病気に冒されたPD-1 (-/-) マウスの心臓に沈着したIgGを酸性抽出によって回収し、直接その反応性を検討した。図6に示すように、PD-1 (-/-) マウスからの溶離

物には野生型BALB/cマウスに比べてはるかに大量のIgGが含まれていた。溶離したIgGは、病気のPD-1 (-/-) マウスの血清によって検出されたものと明らかに同一の特異的な33kDaタンパク質と反応した。この結果は、病気のマウスでは、循環している自己抗体が心臓組織に特異的に結合することを示していた。

実施例8：BALB/c Rag-2 (-/-) マウスへの移入

外見上正常な5週令のPD-1 (-/-) マウスの脾細胞を3匹のBALB/c-Rag-2 (-/-) マウスに静脈を介し、移入した(2000万個/マウス)。単回注射した30週後、1匹のマウスが眼球突出を示した。剖検では典型的な拡張型心筋症であった。このマウスの血清による免疫ブロットでは、1000倍希釈で心臓の33kDa蛋白に対するIgG自己抗体の存在が示された。

実施例9：自己免疫型心筋症治療剤のスクリーニング

実施例1で得たPD-1 (-/-) マウスを用いて、自己免疫疾患、特に拡張型心筋症の治療薬をスクリーニングすることができる。また、自己抗体を産生することにより発症する自己免疫疾患の治療薬のスクリーニングにも使用できる。

本発明のBALB/c系PD-1欠損マウスは拡張型心筋症を発症して死亡する。本PD-1欠損マウスに候補化合物を投与し、その効果を生存・延命を指標に評価すれば、簡単にスクリーニングを行なうことができる。あるいは、本PD-1 (-/-) マウスが産生する自己抗体は請求項6の蛋白を用いたELISA法によって測定が可能である。従って、その自己抗体の産生量を指標にすることによっても、より効率良く治療薬のスクリーニングを行うことが可能である。

参考例1 : BALB/c-PD-1 (-/-)-Rag-2 (-/-) の作成

BALB/c-PD-1 (-/-) マウスをBALB/c-Rag-2
(-/-) マウスに戻し、交配し、BALB/c-PD-1 (-/-) -R
5 ag-2 (-/-) マウス30匹を作出した。

これらのマウスは、45日間の観察期間中生存し、剖検によっても心疾患
の症状は見られなかった。

請求の範囲

1. PD-1 を欠損したBALB/c系マウス。
- 5 2. 請求の範囲1記載のマウスを用いることを特徴とする自己免疫疾患治療剤のスクリーニング方法。
3. 自己抗体を産生することによる自己免疫疾患に対する請求の範囲2記載の自己免疫疾患治療剤のスクリーニング方法。
- 10 4. 自己免疫疾患が拡張型心筋症である請求の範囲2記載のスクリーニング方法。
5. 請求の範囲1記載のマウスが特異的に産生するIgG自己反応性抗体。
- 15 6. 請求の範囲5記載のIgG自己反応性抗体に特異的に反応し、心臓で特異的に産生される33kDa±5kDaの蛋白。
7. 請求の範囲6記載の蛋白を用いることを特徴とする拡張型心筋症の診断
- 20 方法。
8. 請求の範囲7記載の蛋白をコードする遺伝子を検出することを特徴とする拡張型心筋症の（遺伝子）診断方法。

図 1

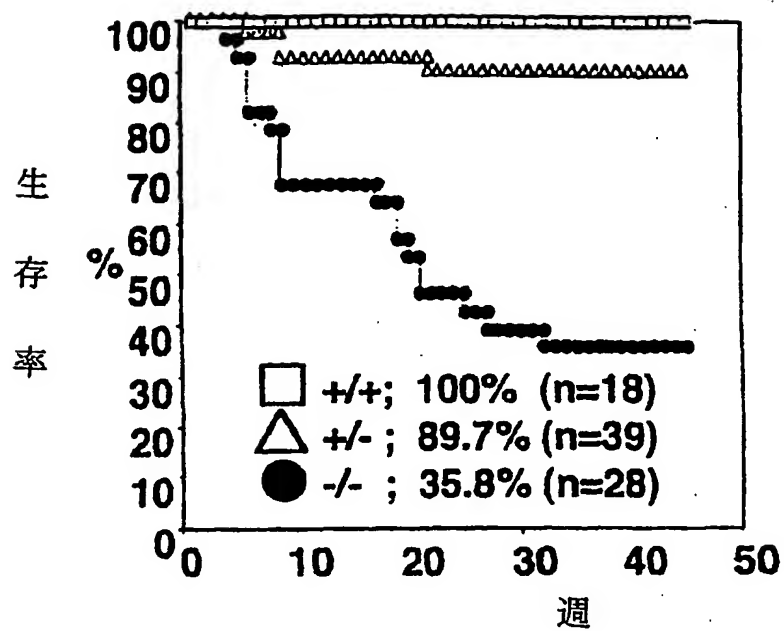


図 2

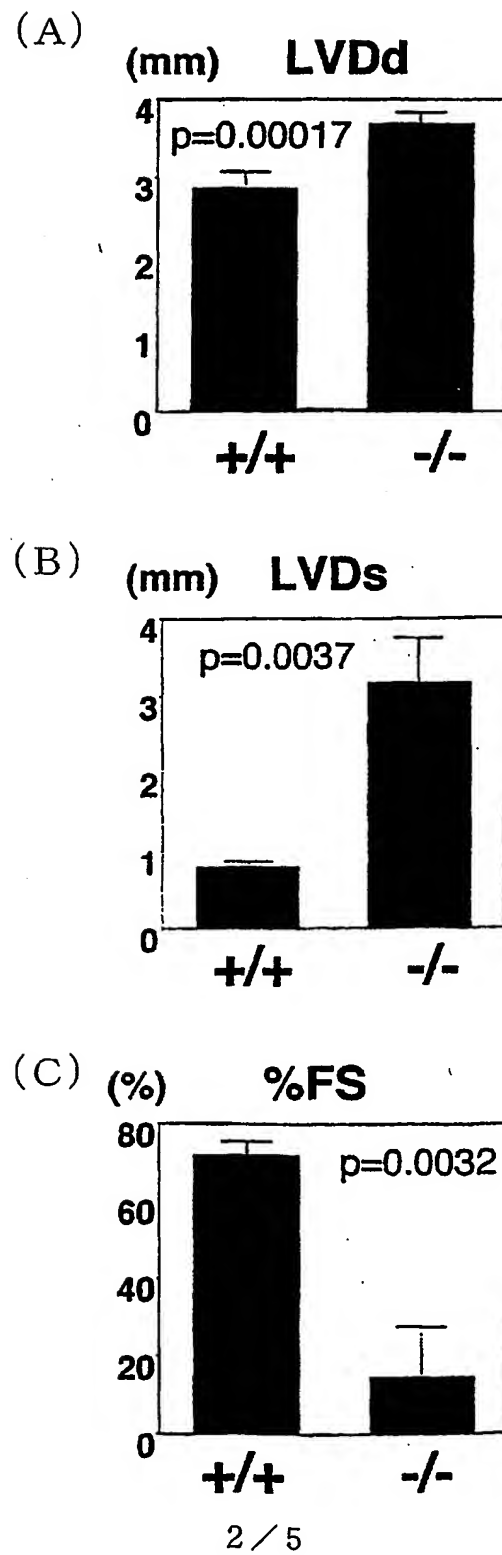


図 3

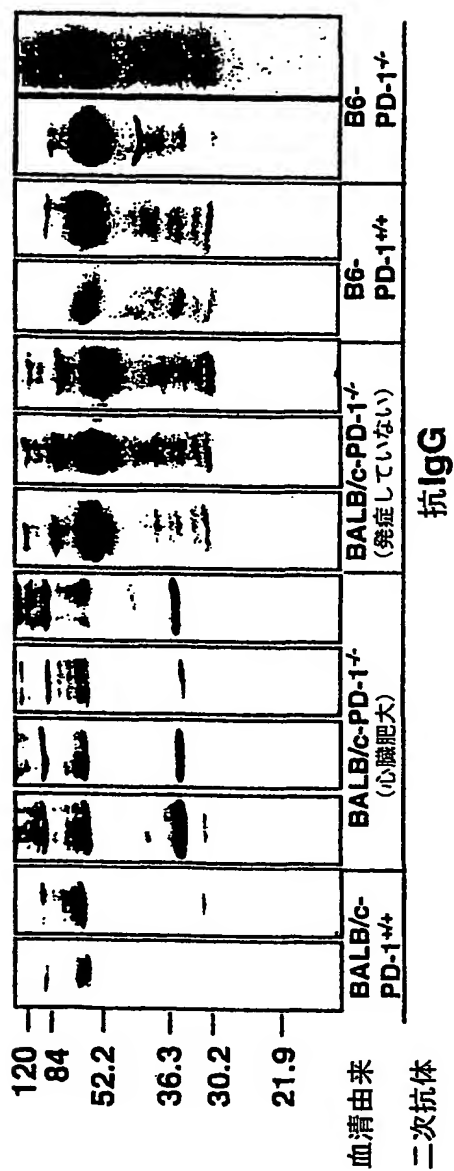


図 4

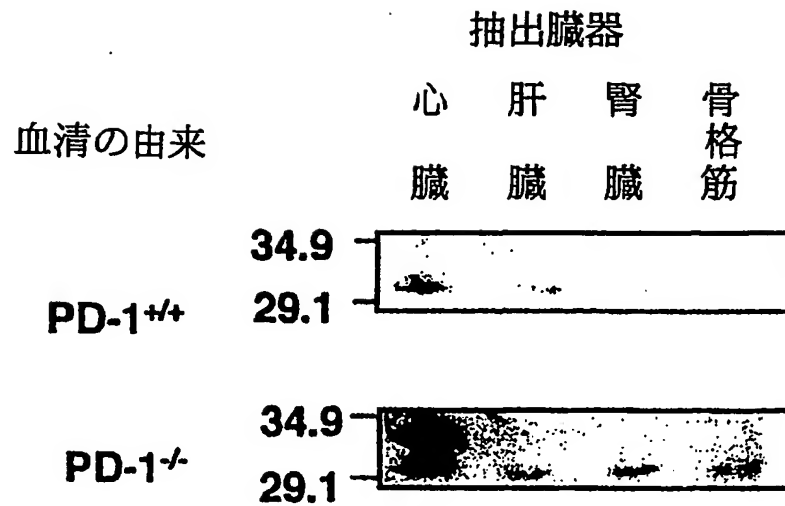


図 5

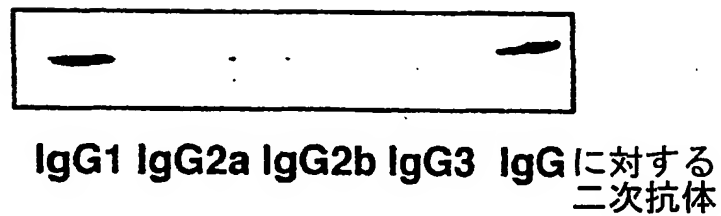
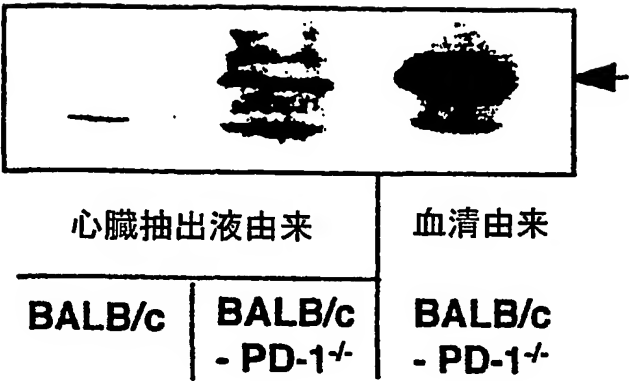


図 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/09951

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A01K 67/027, G01N 33/15, G01N 33/50, C12N 15/12, C07K 16/42, C07K 14/47

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A01K 67/027, G01N 33/15, G01N 33/50, C12N 15/12, C07K 16/42, C07K 14/47

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS, MEDLINE, CAPLUS, WPIDS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	NISHIMURA, H. et al., Science, Vol.291, pages 319 to 322, (2001)	1-8
X A	NISHIMURA, H. et al., Immunity, Vol.11, pages 141 to 151, (1999)	1-4 5-8
X A	NISHIMURA, H. et al., J. Exp. Med., Vol.191(5), pages 891 to 897 (March, 2000)	1-4 5-8
X A	NISHIMURA, H. et al., International Immunology, Vol.10(10), pages 1563 to 1572, (1998)	1-4 5-8
X A	US 5629204 A (Ono Pharmaceutical Co., Ltd.), 13 May, 1997 (13.05.1997), & CA 2143491 A & EP 670369 A2 & JP 7-291996 A & CN 1113518 A & US 5698520 A	1-4 5-8
A	Freeman, G. et al., J. Exp. Med., Vol.192(7), pages 1027 to 1034, (October, 2000)	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
31 January, 2002 (31.01.02)Date of mailing of the international search report
12 February, 2002 (12.02.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer —

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ' A01K 67/027, G01N 33/15, G01N 33/50, C12N 15/12, C07K 16/42, C07K 14/47

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ' A01K 67/027, G01N 33/15, G01N 33/50, C12N 15/12, C07K 16/42, C07K 14/47

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS, MEDLINE, CAPLUS, WPIDS, EMBASE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
T	Nishimura H. et al., Science, vol. 291, pp. 319-322 (2001)	1-8
X	Nishimura H. et al., Immunity, vol. 11, pp. 141-151 (1999)	1-4
A		5-8
X	Nishimura H. et al., J. Exp. Med., vol. 191(5), pp. 891-897 (March 2000)	1-4
A		5-8
X	Nishimura H. et al., International Immunology, vol. 10(10), p. 1563-1572 (1998)	1-4
A		5-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

31. 01. 02

国際調査報告の発送日

12.02.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長井 啓子



2B

9123

電話番号 03-3581-1101 内線 3236

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	US 5629204 A(Ono Pharmaceutical Co., Ltd.)1997.5.13 & CA 2143491 A & EP 670369 A2 & JP 7-291996 A & CN 1113518 A & US 5698520 A	1-4 5-8
A	Freeman G. et al., J. Exp. Med., vol.192(7), pp.1027-1034 (Oc t. 2000)	1-8

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1998年7月)